Aus dem Pathologischen Institut der Universität Düsseldorf

Direktor Prof. Dr. W. Hort

Zum Ablauf der EMC-Virusinfektion in den Langerhansschen Inseln verschiedener Mäusestämme

Untersuchungen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz

DISSERTATION

zur Erlangung

des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

EGBERT STÜEKEN

und

HEINZ SCHANK

1979

1980

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. W. Hort

rusinfektion in den
chiedener Mäusestämme

lfe der indirekten
eszenz

TION

ung

tors der Medizin

r Universität Düsseldorf

von

ÜEKEN

HANK

1979

Stueeken, Egbert

Zum Ablauf der EMC-Virusinfektion in den Langerhansschen Inseln verschiedener Mäusestämme. Untersuchungen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz.

Von Egbert Stüeken und Heinz Schank

1979. 52 S. 8°

Düsseldorf, Univ., Med.Fak., Diss. v. 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

"Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf"

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Krüskemper

Referent
gez.: Prof. Dr. Müntefering

Korreferent
gez.: Prof. Dr. W.A.K. Schmidt

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Inhaltsverzeichnis
==========

1.0	Einleitung	Seite 1
2.0	Material	Seite 4
2.1	Virus	Seite 4
2.2	Versuchstiere	Seite 5
2.3	Antiseren gegen EMC-Viren, Glukagon und Insulin	Seite 6
2.4	Fluoreszinmarkierte Antiseren	Seite 7
3.0	Methodik	Seite 8
3.1	Erzeugung eines Diabetes mellitus durch Infektion mit dem EMC-Virus	Seite 8
3.2	Fluoreszenzmikroskopischer Virusnachweis	Seite 9
3.3	Gleichzeitiger Nachweis von Virus und A-Zellen, Virus und B-Zellen sowie von A- und B-Zellen	Seite 12
4.0	Ergebnisse	Seite 14
4.1	Häufigkeit und Verlauf des Diabetes mellitus	Seite 14
4.2	Immunfluoreszenzmikroskopischer Virusnachweis	Seite 17
4.3	Gleichzeitiger Nachweis von Virus und A-Zellen, Virus und B-Zellen sowie von A- und B-Zellen	Seite 21
5.0	Diskussion	Seite 31
6.0	Zusammenfassung	Seite 39
7.0	Literaturverzeichnis	Seite 40

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543910_0050

1.0 Einleitung

Das Encephalomyokarditis (EMC-)Virus, das zu den Columbia-SK-Viren, einer Untergruppe der Picornaviren, gehört, wurde 1945 während einer epidemischen Myokarditis bei Schimpansen und Gibbons auf Mäusen isoliert (HELWIG et al. 1945). Neben Myocarditiden verursacht das besonders für Mäuse pathogene EMC-Virus auch beim Menschen und beim Affen verschiedene Hirnschädigungen (aseptische Meningitis, Meningoencephalitis, Guillain-Barré-Syndrom) (MELNICK, 1963; STARKE, 1974).

Durch Passagen in weißen Mäusen gelang es CRAIGHEAD (1966), zwei Arten dieses Virus von unterschiedlicher Pathogenität zu gewinnen:
eine encephalotrope E-Variante, die bei Mäusen ein meist rasch zum Tode führendes Krankheitsbild mit geringer Myokarditis, schwerer Encephalitis und schwerer Pankreatitis ohne wesentliche Störung des Zuckerstoffwechsels verursacht, und
eine myocardiotrope M-Variante, bei der eine Myocarditis und eine weitgehend isolierte Schädigung der Langerhansschen Inseln des Pankreas mit passagerer Insulitis im Vordergrund stehen (MÜNTEFERING, 1971; CRAIGHEAD, 1966, 1968).
Zahlreiche Autoren haben mit beiden Varianten des Virus Untersuchungen an verschiedenen Mäusestämmen durchgeführt, wobei nur bei bestimmten Stämmen durch Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus ein länger dauernder Diabetes mellitus erzielt werden konnte. Die Ergebnisse der verschiedenen Autoren sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Diabeteshäufigkeit verschiedener Mäusestämme nach Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus

Stamm	Geschlecht	Häufigkeit	Untersucher
DBA/2	männlich	81 %	Boucher (1973)
DBA/2	männlich	82 %	Craighead (1974)
DBA/2	männlich	54,8 % (max. 75,7 %)	(eigene Befunde[1])
DBA/2	weiblich	< 1 %	(eigene Befunde)
DBA/2	weiblich	0-1,4 %	Boucher (1973)
Cd1	männlich	22 %	Boucher (1973)
Cd1	männlich	10 %	(eigene Befunde)
Cd1	weiblich	0 %	(eigene Befunde)
C 3 H	männlich	2 %	Craighead (1974)
CBA/J	männlich	0 %	
C 57 BL/6N	männlich	0 %	
BALB/6J	männlich	0 %	Boucher (1973)
BALB	männlich	0 %	(eigene Befunde)
BALB	weiblich	0 %	(eigene Befunde)
NMRI	männlich	5 % (max. 6,6 %)	(eigene Befunde)
NMRI	weiblich	< 1 %	(eigene Befunde)

[1] Die in der Tabelle 1 aufgeführten Zahlen der eigenen Befunde beruhen auf einer statistischen Auswertung der Diabeteshäufigkeit von über 5000 Mäusen, die von 1970 bis 1977 bei uns mit verschiedenen Versuchszielen untersucht wurden.

Über die Ursachen dieser unterschiedlichen Diabeteshäufigkeit lagen bisher nur Vermutungen vor.
Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Klärung der Frage, welche Bedeutung der direkten Wirkung des Virus bei Entstehung und Verlauf des Diabetes mellitus zukommt. Zu diesem Zweck waren zunächst methodische Voraussetzungen zu erarbeiten. Es galt, das Virus im Gewebe nachzuweisen und gleichzeitig die durch die Viren geschädigten Zellen zu identifizieren.

2.0 Material

2.1 Virus

Die myocardiotrope M-Variante des EMC-Virus gelangte von Craighead[1] über eine Passage in drei Wochen alten Mäusen, die Rolly[1] durchführte, in Form eines Pools aus Gehirn-, Herz- und Pankreasgewebe in unsere Hand. Das aus verschiedenen Organen mit Ausnahme des Herzen gewonnene Virus entsprach in seinem Gewebetropismus der von Craighead beschriebenen E-Variante. Durch dreimalige Passage in drei Wochen alten Mäusen ließ sich dagegen aus den Herzen moribunder Tiere der letzten Passage ein Viruspool gewinnen, der die Eigenschaften der M-Variante aufwies. Das gleiche Verhalten kennzeichnete auch den Virusstamm, den wir direkt von Craighead erhielten. Auch von diesem Stamm wurde nach drei Passagen aus den Herzen moribunder Tiere ein Viruspool angelegt. Dazu wurde jeweils das homogenisierte Herzgewebe eines moribunden Tieres in 1 ml Earlschem Medium unter Zusatz von 2 % Kälberserum suspendiert und bei -70 °C gelagert. Zur Infektion wurde diese Suspension dann 1:100 mit Earlschem Medium weiterverdünnt[1].

---

[1] Wir danken Prof. J. E. Craighead, Burlington, und Dr. H. Rolly, Farbwerke Hoechst, für die Überlassung des Virusstammes und Prof. Dr. W.A.K. Schmidt, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie (Direktor: Prof. Dr. P. Naumann) der Universität Düsseldorf für die weitere virologische Bearbeitung.

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere verwendeten wir insgesamt 2449 Mäuse, davon 1816 männliche und 72 weibliche Tiere des Stammes NMRI/han (bezogen von der Versuchstieranstalt Hannover-Linden), 51 männliche und 20 weibliche Tiere des Stammes Cd1 und 490 männliche Tiere des Stammes DBA/2 (bezogen von Charles River, Elbeneuf, France).
Die ursprünglich spezifiziert pathogenfreien Tiere wurden im Alter von sechs bis siebzehn Wochen konventionalisiert und in Plastikkäfigen in Gruppen bis zu 10 Tieren auf Granulat (R) bei einer Raumtemperatur von 25 °C gehalten. Altrumin-Fertigfutter für Ratten und Mäuse und Leitungswasser erhielten die Versuchstiere ad libitum.

2.3 Antiseren gegen EMC-Viren, Glukagon und Insulin

Bei der Darstellung des Virus im Gewebe kamen Antiseren gegen EMC-Viren von Kaninchen und Meerschweinchen zur Anwendung. Zur Immunisierung erhielten Kaninchen 1 ml der 1:100 verdünnten Virussuspension[1] am 1., 8., 15. und 36. Tag intravenös appliziert; Meerschweinschen erhielten an den gleichen Tagen jeweils 2ml der 1:100 verdünnten Virussuspension[1] intraperitoneal und 1 ml intramuskulär. Bei beiden Tiergruppen erfolgte die Tötung am 43. Tag nach Immunisierung durch Entbluten in Narkose.

Zur Darstellung der A-Zellen wurden Hyperimmunseren von Meerschweinchen und Kaninchen, die durch mehrfache (mindestens dreimalige) Applikation von Glukagon sensibilisiert worden waren, verwendet. Die Reinheitskontrolle mittels Immunelektrophorese ergab hierbei, daß die von den einzelnen Tieren gebildeten Antikörper unabhängig von der erheblich variierenden Höhe der Antikörpertiter , deutliche Unterschiede in ihrer Spezifität aufwiesen. Wir verwenden deshalb ausschließlich Seren mit der größten Spezifität.

Zur Darstellung der B-Zellen wurden Hyperimmunseren von Kaninchen und Meerschweinchen benutzt, die mindestens dreimal im Abstand von mehreren Wochen mit Rinderinsulin immunisiert worden waren. Die Höhe der Antikörpertiter variierte noch stärker als die Titer der Antikörper gegen Glukagon. Es gelangten nur die Seren zur Anwendung, die noch in einer Verdünnung von 1:800 Insulin inaktivierten.

Eine Immunisierung mit Mäuseinsulin, die ohnehin wegen des Fehlens der dazu notwendigen Insulinmenge kaum möglich gewesen wäre, erwies sich als unnötig, da sich mit den vorhandenen Antiseren noch in einer Verdünnung von 1:160 die B-Zellen in Mäusepankreata darstellen ließen.

---

[1] Virussuspension: Ein Herz einer moribunden Maus in 1 ml Earlschem Medium

2.4 Fluoreszinmarkierte Antiseren

Als markierte Antiseren dienten das fluoresciniso-thiocyanat (FITC)-markierte Antikaninchen-Immunglobulin vom Schaf (Deutsche Wellcome, Großburgwedel) und das ebenfalls FITC-markierte Antimeerschweinchen-Immunglobulin von der Ziege (Mecon, Berlin). Weiterhin wurden das tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC)-markierte Antikaninchenglobulin von der Ziege und das ebenfall TRITC-markierte Antimeerschweinchenglobulin von der Ziege (Cappel Laboratories New York, N.Y.) verwendet.

3.0 Methodik

3.1 Erzeugung eines Diabetes mellitus durch Infektion mit dem EMC-Virus

Zur Erzeugung eines Diabetes mellitus wurde ein Teil der Mäuse im Alter von 6-12 Wochen nach vorhergehender Blutentnahme für die Basisblutzucker-Bestimmung morgens zwischen 8 und 10 Uhr durch subkutane Injektion von 0,5 ml der verdünnten Virussuspension infiziert. Bei kleineren Tiergruppen wurde die Infektion nach 18-stündigem Nahrungsentzug durchgeführt, oder es wurde am Infektionstag und den beiden darauffolgenden Tagen zusätzlich jeweils 1 mg eines wasserlöslichen Cortisons intramuskulär injiziert. Tiere der Kontrollgruppen erhielten bei sonst gleicher Behandlung je 0,5 ml Earlscher Lösung.
Das Vorliegen einer diabetischen Stoffwechsellage wurde bei allen Tieren durch tägliche Kontrollen auf Glukosurie mittels Glukotest (R) und durch tägliche Glukosedoppelbestimmungen im Venenblut aus den Infraorbitalsinus vom dritten Tag nach Infektion an mit der o-Toluidin oder der GOD-Perid-Methode auf dem Autoanalyzer durchgeführt. Bei größeren Tiergruppen wurde außerdem ein Glukosetoleranztest durchgeführt.

3.2 Fluoreszenzmikroskopischer Virusnachweis

Zum Nachweis des EMC-Virus wurden insgesamt 161 Mäuse (männliche und weibliche Tiere des Stammes NMRI/han und ausschließlich männliche Tiere des Stammes DBA/2) im Alter von 6 - 18 Wochen mit der E- oder M-Variante des EMC-Virus infiziert. Die Tötung erfolgt im Abstand von 12, 16, 24, 34, 36, 38, 40, 42, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 62 Stunden oder 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder 11 Tagen nach der Infektion durch Entbluten in Narkose.

Von den noch intravital in Narkose entnommenen Pankreata wurden aus 3 bis 4 Schnittebenen im Abstand von 300 µ mindestens je 4 etwa 5 µ dicke Gefrierschnitte im Kryostaten angefertigt, auf entfettete Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Nach fünfzehnminütiger Fixierung in kaltem Aceton erfolgte die erste Beschichtung mit Anti-EMC-Hyperimmunserum vom Kaninchen oder vom Meerschweinchen, das mit Coonsscher Pufferlösung (pH 7,4) 1:5 bis 1:50 verdünnt war. Die Objektträger wurden dazu für 15 bis 120 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer belassen und zwischenzeitlich ein bis dreimal vorsichtig bewegt. Anschließend wurden die Präparate 15 Minuten lang mit fließendem Coons-Puffer abgespült, kurz getrocknet und dann mit FITC-markiertem Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Meerschweinchen-Immunglobulin (1:5 bis 1:20 mit Coons-Puffer verdünnt) 30 bis 60 Minuten lang in feuchter Kammer beschichtet. Nach nochmaligem Spülen mit Pufferlösung wurden die Präparate mit Coons-Puffer oder mit 90%igem gepuffertem Glyzerin (pH 8,8) eingedeckt. Eine Übersicht über dieses Verfahren ist aus Tabelle 2 zu ersehen.

Als Kontrollpräparate dienten 1. Gefrierschnitte von Pankreata nichtinfizierter Mäuse, die wie die infizierten Tiere behandelt worden waren, 2. Gefrierschnitte der Versuchstiere, die statt mit Anti-EMC-Serum mit antikörperfreiem Serum beschichtet worden waren, und 3. Nativpräparate des Versuchstieres zur Prüfung auf Autofluoreszenz.

Infektion:	subkutane Applikation von 0,5 ml des 10^{-2} mit Earlscher Lösung verdünnten Viruspools der M-Variante des EMC-Virus
Zeitpunkt der Tötung:	38 bis 52 Stunden nach Infektion
Gewebsschnitte:	5 µ dicke Kryostatschnitte aus mehreren, 300 µ voneinander entfernten Ebenen
Fixierung:	nach Lufttrocknung 15 Minuten in kaltem Aceton
Erstbeschichtung:	Anti-EMC-Hyperimmunserum vom Kaninchen, 1:5 mit Coonsscher Pufferlösung verdünnt, 30 Minuten bei 37 °C in feuchter Kammer
Spülung:	15 Minuten mit langsam fließender Coons-Pufferlösung (pH 7,4)
Zweitbeschichtung:	FITC-markiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin vom Schaf, 1:10 mit Coons-Pufferlösung (pH 7,4) verdünnt, 30 Min. bei 37 °C in feuchter Kammer
Eindeckmittel:	90 %iges gepuffertes Glyzerin (pH 8,8)

Tabelle 2: Technik der immunfluoreszenzmikroskopischen Darstellung des EMC-Virus im Pankreas infizierter Mäuse

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen stand das "Große Forschungsmikroskop" der Fa. ZEISS zur Verfügung. Als Lichtquelle diente eine 200 Watt Quecksilber-Höchstdrucklampe. Bei der Wahl der Filterkombinationen (Anregung mit BG 12 und/oder KP500, Sperrfilter 50 für die FITC-Fluoreszenz bzw. LP 546 und Sperrfilter 59 für die TRITC-Fluoreszenz) wurden die Excitations- und Emissionsmaxima der beiden Fluorochrome berücksichtigt.
Die Dokumentation der erhobenen Befunde erfolgte bei der Virusdarstellung durch fotografische Aufnahmen auf Kodak Tri-X oder Ektachrome High speed-Kleinbildfilm bei einer Gesamtvergrößerung von 125- bis 500fach.
Bei gleichzeitiger Darstellung zweier Antigene wurden entweder nacheinander eine Aufnahme der FITC- und dann der TRITC-Fluoreszenz des Präparates angefertigt, oder es wurde durch Doppelbelichtung eines Farbdiafilmes mit zwischenzeitlichem Wechsel der Filterkombination ein Mischbild mit FITC- und TRITC-Fluoreszenz hergestellt.

3.3 Gleichzeitiger Nachweis von Virus und A-Zellen, Virus und B-Zellen sowie von A- und B-Zellen

Zur gleichzeitigen Darstellung von Virus und A-Zellen bzw. Virus und B-Zellen wurden 41 Mäuse der Stämme NMRI/han und DBA/2 mit der M-Variante des EMC-Virus infiziert und nach 38 bis 72 Stunden getötet.
Zur Darstellung der Spätschäden nach Virusinfektion wurden die Pankreata von 9 Mäusen des Stammes DBA/2 untersucht, bei denen ein virusinduzierter Diabetes mellitus von 4 bis 18 Wochen Dauer bestanden hatte.
Als Kontrollen wurden die Bauchspeicheldrüsen von 11 gesunden Mäusen der drei Tiergruppen, die jeweils gleichzeitig mit den Versuchstiergruppen durch Injektion von Earlschem Medium scheininfiziert worden waren, untersucht.
Im Rahmen der methodischen Voruntersuchungen wurden auch Gewebsschnitte von in Paraplast (R) eingebetteten Pankreata angefertigt. Diese wurden mit Eiweißglyzerin auf Objektträger aufgebracht und bei 60 °C zwei bis drei Tage lang getrocknet. Das Einbettmittel wurde durch Xylol herausgelöst. Die weitere Behandlung entsprach der der Gefrierschnitte. Die Methodik der gleichzeitigen Darstellung von zwei Antigenen baut auf dem fluoreszenzoptischen Virusnachweis auf. Die in Vorversuchen ermittelten Einzelheiten der Technik gehen aus Tabelle 3 hervor.

Tab. 3

Schema: Technik der gleichzeitigen Darstellung von A-Zellen und EMC-Virus bzw. G-Zellen und EMC-Virus sowie A-Zellen und B-Zellen

	A-Zellen	EMC-Virus	B-Zellen	A-Zellen
1. Immunreaktion	Anti-Glukagon-Hyperimmunserum vom Meerschweinchen 1:10 mit COONS-Puffer verdünnt	Anti-EMC-Virus-Hyperimmunserum vom Kaninchen 1:5 mit COONS-Puffer verdünnt	Anti-Insulin-Hyperimmunserum vom Meerschweinchen 1:20 mit COONS-Puffer verdünnt	Anti-Glukagon-Hyperimmunserum vom Kaninchen 1:10 mit COONS-Puffer verdünnt
	Mischung gleicher Volumina	Mischung gleicher Volumina	Mischung gleicher Volumina	
	Inkubation: 30 Minuten bei 37° C in feuchter Kammer			
	Abspülen: 15 Minuten mit COONS-Puffer (pH 7,4)			
2. Immunreaktion	TRITC-markiertes Anti-Meerschweinchen-Immunglobulin von der Ziege 1:10 mit COOns-Puffer verdünnt	FITC-markiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin vom Schaf 1:5 mit COONS-Puffer verdünnt	TRITC-markiertes Anti-Meerschweinchen-Immunglobulin von der Ziege 1:10 mit COONS-Puffer verdünnt	FITC-markiertes Anti-KaninchenImmunglobulin vom Schaf 1:10 mit COONS-Puffer verdünnt
	Mischung gleicher Volumina	Mischung gleicher Volumina	Mischung gleicher Volumina	
	Inkubation: 30 Minuten bei 37° C in feuchter Kammer			
	Abspülen: 15 Minuten mit COONS-Puffer (pH 74,)			
	Eindecken: 90 %iges gepuffertes Glyzerin			
Filterkombination Anregungsfilter: Sperrfilter	LP 546 59	BG 12 und/oder KP 500 50	LP 546 59	BG 12 und/oder KP 500 50

4.0 Ergebnisse

4.1 Häufigkeit und Verlauf des Diabetes mellitus

Durch Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus konnte in unseren Versuchen bei weiblichen NMRI-Mäusen sowie bei männlichen und weiblichen Cd1-Mäusen in keinem Fall ein Diabetes erzeugt werden.
Männliche NMRI-Mäuse wiesen lediglich in 1,3 % der Fälle eine vorübergehende Hyperglykämie mit Glukosurie auf; bei Tieren, die den 14. Tag p.i. überlebten, fand sich nur noch in Einzelfällen ein Diabetes.
Männliche NMRI-Mäuse, die nach EMC-Infektion zusätzlich täglich 1 mg Cortison erhalten hatten, entwickelten in 2,8 % der Fälle eine kurzzeitige diabetische Stoffwechsellage. In dieser Gruppe war die Sterblichkeit der Tiere jedoch so hoch, daß kein Tier den 7. Tag p.i. überlebte.

Die männlichen DBA/2-Mäuse entwickelten in 58,5 % der Fälle einen Diabetes, der in 31,8 % der Fälle länger als 4 Wochen andauerte. Dabei war bei allen diabetischen Tieren konstant eine Glukosurie nachweisbar. Sofern Glukosetoleranztests durchgeführt wurden, fielen diese bei allen diabetischen Tieren pathologisch aus. Plasmainsulinspiegel, die bei kleineren Tiergruppen bestimmt wurden, ergaben kaum meßbare Werte. Dieselben Tiere zeigten in den isolierten Langerhansschen Inseln ein völliges Versiegen der Insulinsekretion und der Proinsulinsynthese (PETERSEN et. al, 1976).
Von insgesamt 82 männlichen DBA/2-Mäusen konnte der Blutglukosespiegel bis zur 18. Woche post infectionem verfolgt werden. Von diesen 82 Tieren entwickelten 34 (41,5 %) zu keinem Zeitpunkt nach Infektion einen Diabetes. Bei den restlichen 48 Tieren stieg der Blutglukosespiegel konstant an und erreichte am 7. Tag p.i.

einen Gipfel. Danach vollzog sich eine deutliche Trennung in zwei Gruppen: Bei 22 Tieren (26,7 %) fiel der Blutglukosespiegel zwischen der 1. und 3. postinfektiösen Woche wieder in den normoglykämischen Bereich ab und erreichte auch danach nie wieder diabetische Werte, während 26 Tiere (31,8 %) bei relativ konstanter Hyperglykämie mit Werten zwischen 470 und 590 mg/% chronisch diabetisch blieben (Tab. 4; Abb. 1).

Zeitpunkt der Blutentnahme	Basis-wert vor Infektion	1 Woche p.i.	3 Wochen p.i.	4 Wochen p.i.	11 Wochen p.i.	12 Wochen p.i.	13 Wochen p.i.	18 Wochen p.i.
34 Tiere (41,5 %) ohne Hyperglykämie	128	145	177	156	127	163	121	-
22 Tiere (26,7 %) mit vorübergehender Hyperglykäm.	136	308	288	248	150	174	132	-
26 Tiere (31,8 %) mit permanenter Hyperglykämie	127	461	471	494	526	591	513	514

Tab. 4: Blutglukosewerte bei 82 DBA-Mäusen in verschiedenen Intervallen nach Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus (Mittelwerte der einzelnen Gruppen in mg/100 ml Serum)

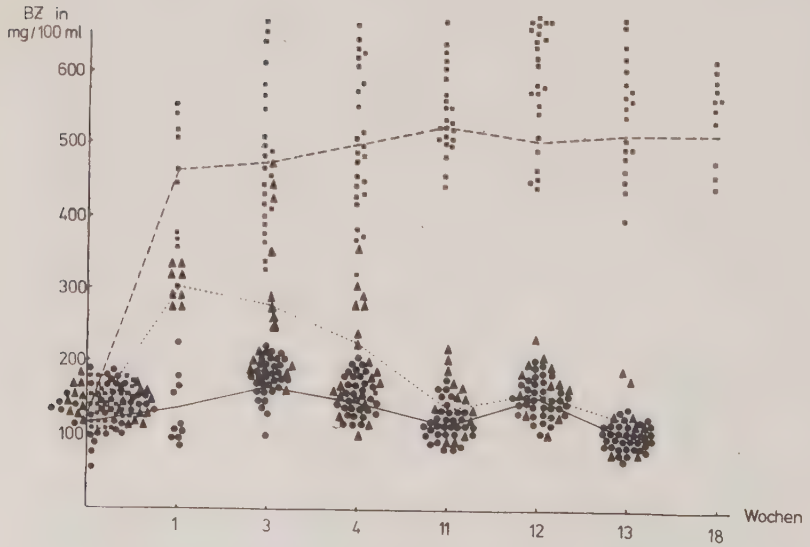


Abb. 1: Blutglukosewerte bei 82 DBA-Mäusen in verschiedenen Intervallen nach Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus

4.2 Immunfluoreszenzmikroskopischer Virusnachweis

Zur histologischen Untersuchung gelangten über 2000 Pankreasschnitte, wobei Mäusestamm, Alter und Geschlecht der Tiere, Variante und Menge des verimpften Virus, Zeitspanne zwischen Infektion und Tötung, Art und Dauer der Fixierung des Gewebes, Herkunft und Verdünnung des Anti-EMC-Immunserums sowie der Modus der Beschichtung, Dauer des Abspülens der Immunseren, Konzentration, Dauer und Temperatur der Zweitbeschichtung mit FITC-markiertem Antiserum und verwendetes Eindeckmittel variiert wurden. Nach diesen umfangreichen Voruntersuchungen erwies sich die in Tabelle 2 (Seite 10) angegebene Versuchsanordnung zur Darstellung des EMC-Virus als optimal.

Mit Hilfe dieser Technik ließ sich das Virus in allen untersuchten Pankreata infizierter DBA/2- und NMRI-Mäuse von der 38. Stunde nach Infektion an nachweisen. Dabei zeigte sich, daß das Virus mit Ausnahme einiger weniger extrainsulär gelegener Zellen ausschließlich Inselgewebe befiel. Dieser Befund war identisch bei allen histologisch untersuchten Tiergruppen (männliche DBA/2- sowie männliche und weibliche NMRI-Mäuse). In der Frühphase der Virusschädigung stellte sich das Virus in Form einer feingranulierten Fluoreszenz im Plasma der betroffenen Zellen dar (Abb. 2). Der noch intakte Zellkern wies keine Fluoreszenz auf (Abb. 3). Die im weiteren Verlauf der Infektion auftretenden Nekrosen der Zellen waren gekennzeichnet durch eine grobschollige Virusfluoreszenz. Eine Differenzierung von Zellgrenzen, Zellkernen und Cytoplasma war in diesem Stadium nicht mehr möglich (Abb. 4). Im zeitlichen Ablauf der Virusschädigung ließen sich nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen finden, im Ausmaß ließen sich keine Differenzen feststellen. Die Verteilung der virusgeschädigten Inselbezirke variierte innerhalb ein und desselben Organs: Während in einzelnen Inseln nur einzelne Zellen durch das Virus geschädigt waren, zeigten andere einen Virusbefall von mehr als 50 % des Inselgewebes.

Abb. 2: Darstellung von EMC-Virus im Cytoplasma zahlreicher Zellen einer Langerhansschen Insel, männliche NMRI-Maus 40 Std. nach Infektion; indirekte Immunfluoreszenz; Vergr.: 250fach

Abb. 3: Darstellung von EMC-Virus im Cytoplasma einer isolierten B-Zelle in einer Langerhansschen Insel; für RNS-Viren typische Kernaussparung; männliche NMRI-Maus 40 Std. nach Infektion; indirekte Immunfluoreszenz; Vergr.: 2500fach

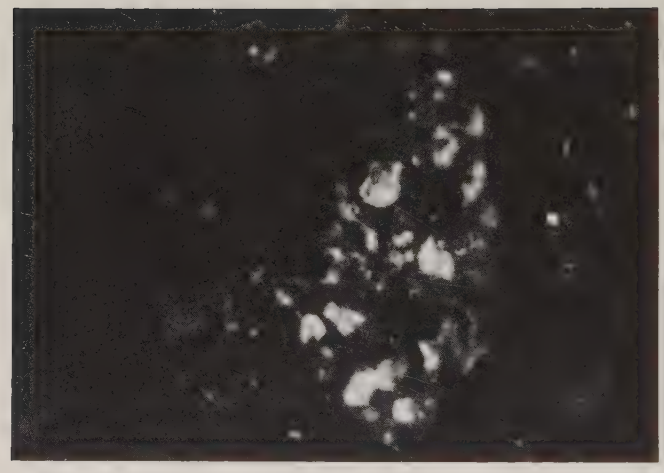


Abb. 4: Darstellung von EMC-Virus in herdförmigen Nekrosen des Inselgewebes mit Auflösung der Zellstrukturen; daneben noch erhaltene Inselzellen mit diffusem Virusbefall des Cytoplasmas und typischer Kernaussparung; männliche NMRI-Maus 50 Std. nach Infektion; indirekte Immunfluoreszenz; Vergr.: 1250fach

4.3 Gleichzeitiger Nachweis von Virus und A-Zellen, Virus und B-Zellen sowie A- und B-Zellen

Aufbauend auf dem POETSCHKE et al. (1959) beschriebenen Verfahren zur gleichzeitigen fluoreszenzmikroskopischen Darstellung verschiedener Antigene entwickelten wir in Voruntersuchungen die in Tabelle 3 (Seite 13) detailliert dargestellte Methode. Damit gelang uns der gleichzeitige Nachweis von:

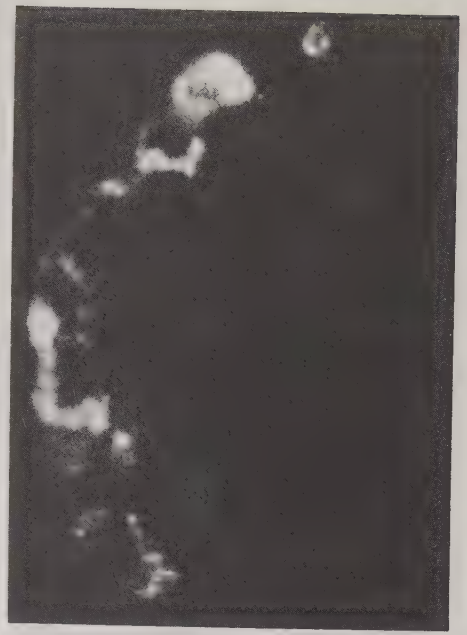
1. A-Zellen und EMC-Virus,
2. B-Zellen und EMC-Virus,
3. A-Zellen und B-Zellen.

Die Untersuchung Langerhansscher Inseln gesunder Mäuse der Stämme DBA/2 und NMRI ergab keine auffälligen Differenzen hinsichtlich ihrer Größe oder ihres Aufbaus. Bei orientierenden Messungen belief sich der Anteil der A-Zellen auf 14 %, der der B-Zellen auf 83 %. Daneben fanden sich 3 % Zellen innerhalb der Inseln, die weder Insulin noch Glukagon enthielten. A-Zellen und B-Zellen waren innerhalb des Inselgewebes nicht gleichmäßig verteilt: In den Randpartien waren mehr A-Zellen lokalisiert als in zentralen Inselabschnitten. Tangentiale Anschnitte von Langerhansschen Inseln zeigten daher in Einzelfällen über 50 % A-Zellen. Im Gegensatz zum Mantelbereich, wo Gruppen von 2 oder 3 benachbarten A-Zellen häufig sind, fanden sich in zentralen Inselabschnitten nur einzeln liegende A-Zellen. Außerhalb der Langerhansschen Inseln konnten in keinem der untersuchten Pankreata Glukagon enthaltende Zellen nachgewiesen werden. Dagegen fanden sich auch im exokrinen Gewebe der untersuchten Organe einzelne Zellen oder Gruppen von 2 - 5 Zellen, die sowohl wegen ihrer Form als auch wegen ihres Gehaltes an Insulin zu den B-Zellen zu rechnen waren. Während diese Zellanordnung bei einigen der untersuchten Organe in allen Schnittebenen zu beobachten war, konnten in anderen Bauch-

speicheldrüsen - unabhängig vom Tierstamm - in keinem Schnitt extrainsuläre B-Zellen nachgewiesen werden.

Bei gleichzeitiger Darstellung von A-Zellen und EMC-Virus konnte bei keiner der drei untersuchten Versuchstiergruppen Virusantigen in einer A-Zelle nachgewiesen werden. Häufig waren Inselabschnitte vom Virus geschädigt, die gänzlich frei von A-Zellen waren. In einigen Fällen fand sich aber auch ein Virusbefall der an A-Zellen reichen Peripherie der Insel, wobei aber die A-Zellen selbst immer ausgespart blieben (Abb.5).
Daneben wurde gelegentlich beobachtet, daß einzelne schmale A-Zellen eingeschlossen waren von mehreren Zellen mit deutlicher Virusfluoreszenz (Abb. 6).

a)



b)

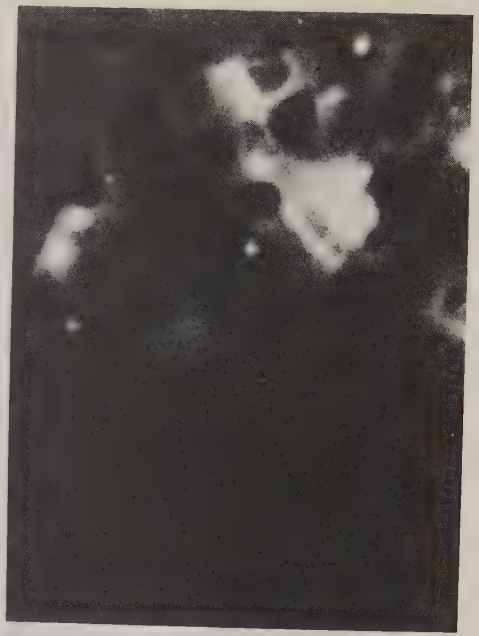
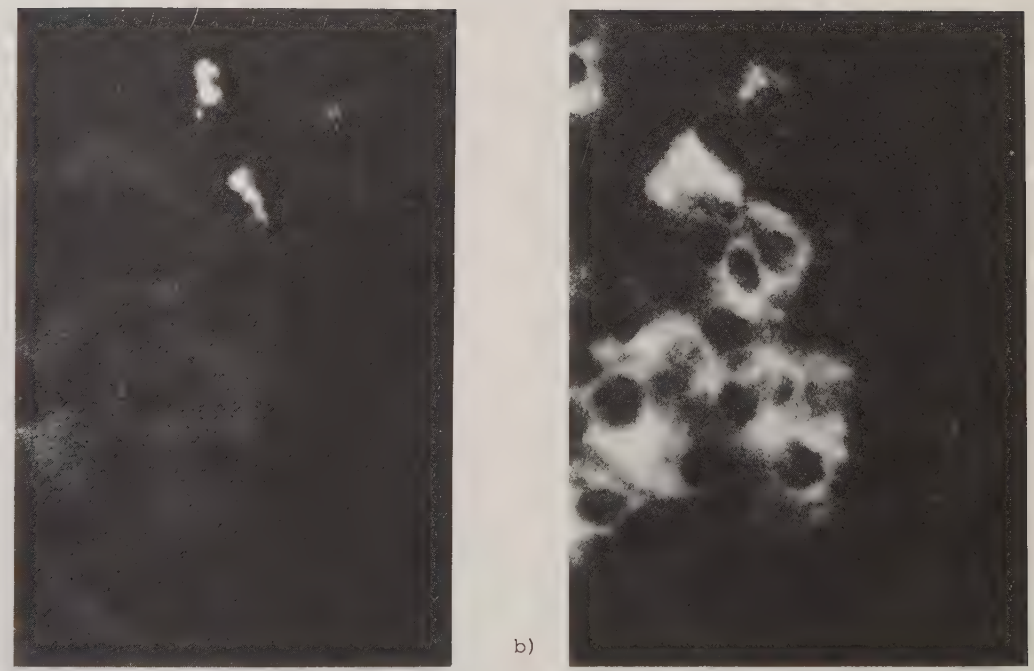


Abb. 5: Gleichzeitige Darstellung von A-Zellen (a) und Virusantigen (b) in identischen Inselabschnitten einer männlichen DBA/2-Maus 50 Std. nach Infektion; indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung zweier Fluorochrome; Vergr.: 1250fach

a) Häufung von A-Zellen im Randbereich einer Langerhansschen Insel

b) Virusantigen in der gleichen Insel mit deutlicher Aussparung der A-Zellen



a) b)

Abb. 6: Gleichzeitige Darstellung von A-Zellen (a) und Virusantigen (b) in identischen Inselabschnitten einer männlichen DBA/2-Maus 72 Std. nach Infektion; indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung zweier Fluorochrome; Vergr.: 1250fach

a) einzelne A-Zellen im Randbereich einer Insel

b) Häufung von Zellen mit Virusfluoreszenz in dem gleichen Inselabschnitt unter Aussparung der A-Zellen

Im Gegensatz zu den A-Zellen zeigten die B-Zellen einen deutlichen EMC-Virusbefall: 28 Stunden nach Infektion mit der M-Variante des Virus wiesen die ersten B-Zellen innerhalb der Langerhansschen Inseln eine Virusfluoreszenz auf. Bei stärkerer Vergrößerung war zu erkennen, daß die Viren in diesem Stadium der Infektion nur einen kleinen Teil des Cytoplasmas der geschädigten Zellen einnahmen. Die Intensität der Insulinfluoreszenz war nicht sichtbar schwächer als bei virusfreien B-Zellen (Abb. 7).
Im Inselgewebe von Mäusen, die 42 bis 46 Stunden nach Infektion getötet worden waren, vergrößerte sich der Anteil der virusgeschädigten B-Zellen. Gleichzeitig schien die immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisbare Insulinmenge in den einzelnen B-Zellen mit Virusfluoreszenz geringer zu sein, und es nahm die Gesamtzahl intakter B-Zellen ab. Bereits zu diesem Zeitpunkt, noch deutlicher nach 50 bis 54 Stunden, sah man innerhalb der Langerhansschen Inseln kernlose Gewebsteile mit starker Virusfluoreszenz, die jedoch weder Insulin noch Glukagon enthielten. Vermutlich handelt es sich bei diesen Zellfragmenten um durch das Virus zerstörte B-Zellen, in denen die Antigenität des Virus noch erhalten blieb. Nach länger zurückliegender Infektion ging die Menge von nachweisbarem Virusantigen im Gewebe deutlich zurück. 72 Stunden nach Infektion konnte nur noch in vereinzelten B-Zellen Virusantigen nachgewiesen werden (Abb. 8). 96 Stunden nach Infektion war kein Virusantigen mehr nachweisbar.
Von geringen zeitlichen Verschiebungen abgesehen - die akute Infektionsphase schien bei NMRI-Mäusen geringfügig schneller abzulaufen als bei DBA/2-Mäusen - waren die erhobenen Befunde bei männlichen und weiblichen NMRI-Mäusen und männlichen DBA/2-Mäusen, trotz unterschiedlicher Diabeteshäufigkeit, gleich. Bei allen untersuchten Tiergruppen schädigte die M-Variante des EMC-Virus isoliert die B-Zellen.

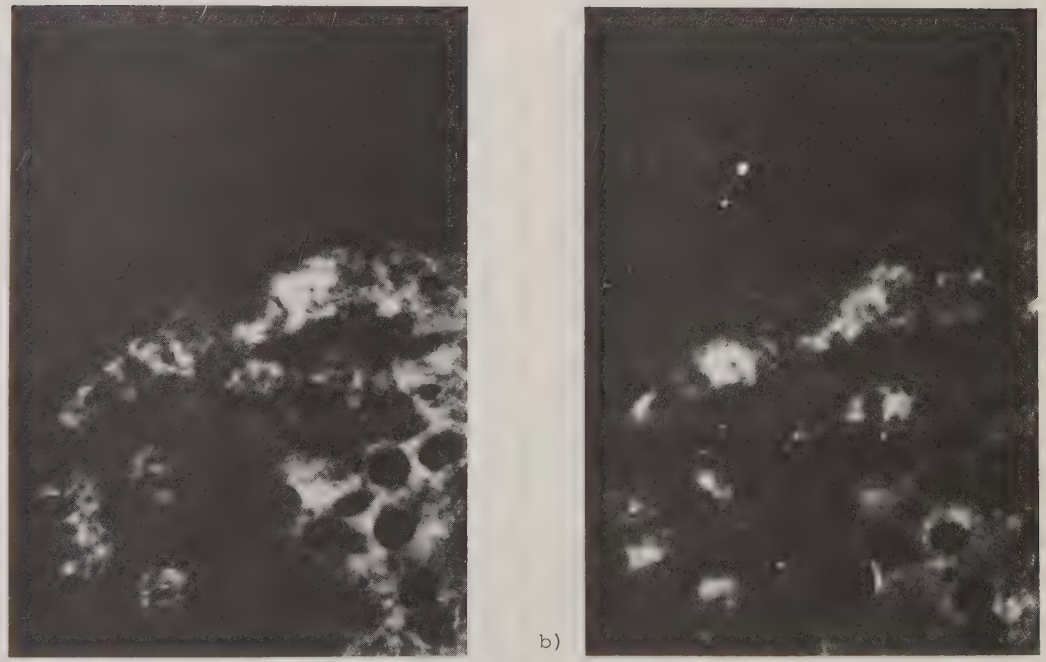


Abb. 7: Gleichzeitige Darstellung von B-Zellen (a) und Virusantigen (b) in identischen Inselabschnitten einer männlichen DBA/2-Maus 40 Std. nach Infektion; indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung zweier Fluorochorme; Vergr.: 1250fach

a) TRITC-markierte B-Zellen (im Präparat rotfluoreszierend)

b) FITC- markiertes Virusantigen ausschließlich in B-Zellen (im Präparat grünfluoreszierend)

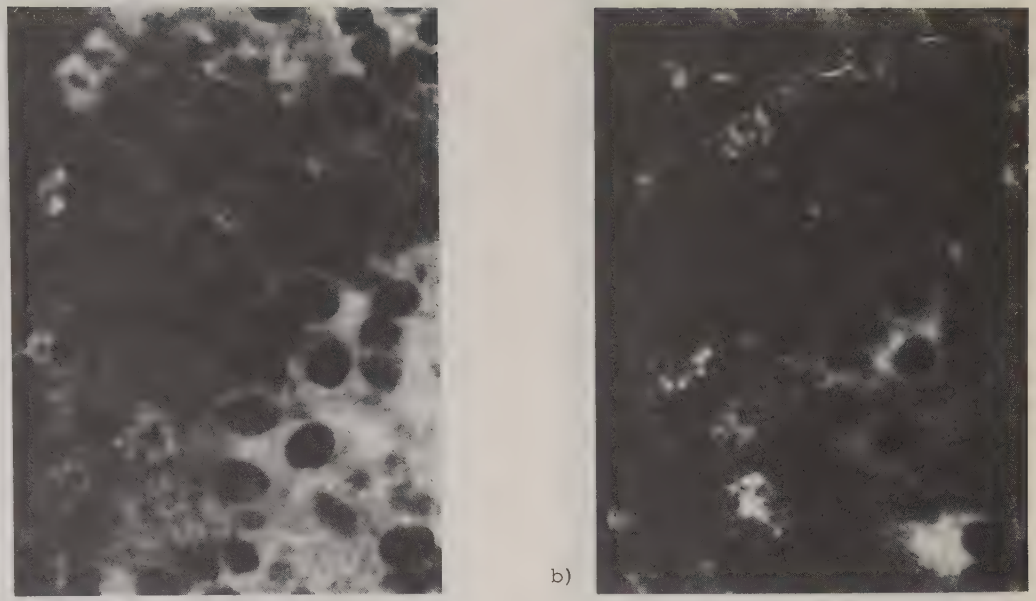


Abb. 8: Gleichzeitige Darstellung von B-Zellen (a) und Virusantigen (b) in identischen Inselabschnitten einer männlichen NMRI-Maus 72 Std. nach Infektion; indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung zweier Fluorochrome; Vergr.: 1250fach

a) TRITC-markierte B-Zellen mit starker Virusschädigung und teilweiser Auflösung der Zellstrukturen

b) FITC-markiertes Virusantigen ausschließlich in B-Zellen; deutlich weniger als in der Frühphase der Infektion

Die Tiere, bei denen ein virusinduzierter Diabetes von 4 bis 18 Wochen Dauer bestanden hatte, zeigten im wesentlichen folgende Befunde: Die Pankreata waren makroskopisch kleiner und fester als die der Kontrolltiere. Die Zahl der Langerhansschen Inseln pro Schnittfläche war geringer, die Inseln selbst entrundet. Der mittlere Inseldurchmesser war in Einzelfällen bis auf 60 % des Inseldurchmessers der nichtinfizierten Tiere reduziert. Bei der gleichzeitigen Darstellung von A-Zellen und B-Zellen zeigte sich, daß in Abhängigkeit von Dauer des Diabetes die Zahl der B-Zellen weiterhin abnahm und gleichzeitig die Zahl der A-Zellen zuzunehmen schien. Außerdem waren die A-Zellen nicht mehr nur vorwiegend im Randbereich der Inseln lokalisiert, sondern diffus in allen Inselabschnitten verteilt. (Abb. 9 u. 10)

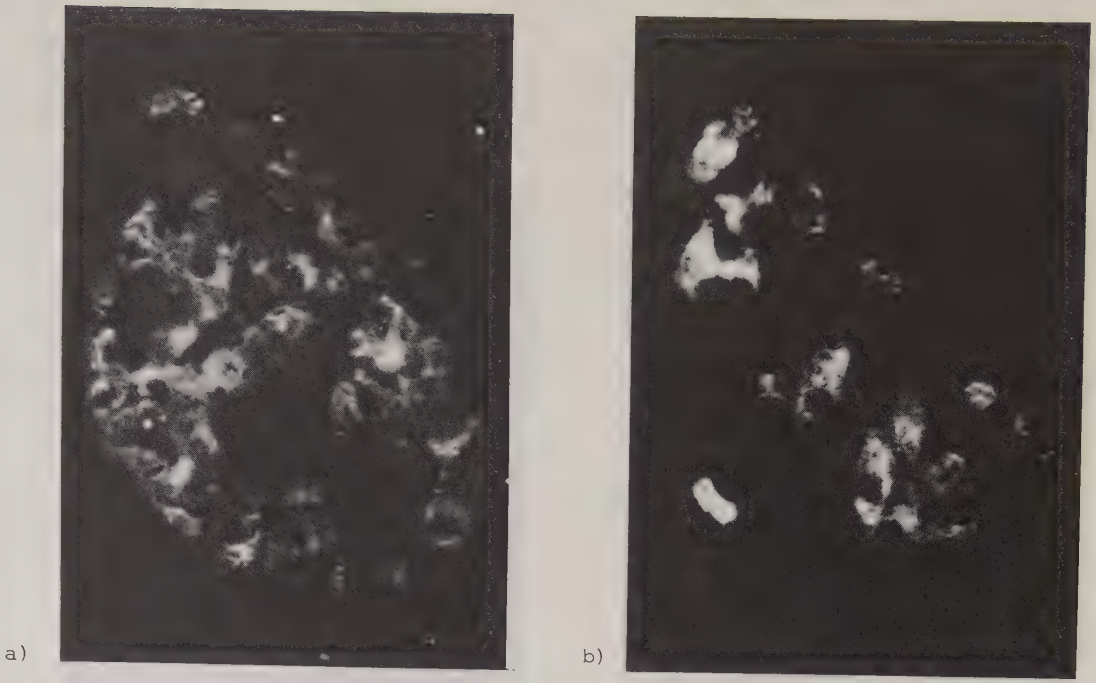


Abb. 9: Gleichzeitige Darstellung von A-Zellen (a) und B-Zellen (b) in einer Langhansschen Insel einer männlichen DBA/2-Maus 4 Wochen nach Infektion; indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung zweier Fluorochrome; Vergr.: 500fach

a) diffus über die ganze Insel verteilte A-Zellen (FITC-markiert, im Präparat rofluoreszierend)

b) nur noch vereinzelt erhalten gebliebene B-Zellen in der gleichen Insel (TRITC-markiert, im Präparat grün fluoreszierend)

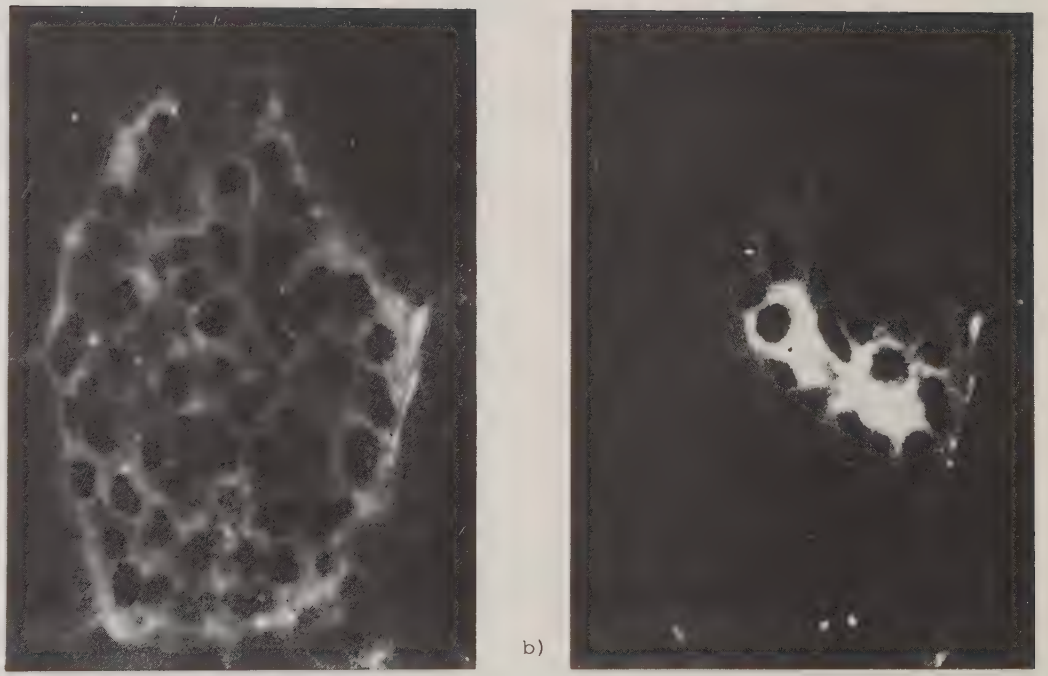


Abb. 10: Gleichzeitige Darstellung von A-Zellen (a) und B-Zellen (b) in einer Langerhansschen Insel einer männlichen DBA/2-Maus 16 Wochen nach Infektion; indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung zweier Fluorochrome; Vergr.: 500fach

a) fast ausschließlich aus A-Zellen bestehende Insel

b) weiter fortgeschrittener Schwund der B-Zellen

5.0 Diskussion

Nur bei wenigen Mäusestämmen kommt es nach der Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus zu einem Diabetes mellitus. Bei dem von uns untersuchten NMRI-Stamm ließ sich bei Männchen lediglich in 1,3 % der Fälle eine kurzdauernde diabetische Stoffwechsellage erzeugen. Durch gleichzeitige Gabe von Cortison kam es zwar zu dem von CRAIGHEAD (1968) beschriebenen Anstieg der Diabeteshäufigkeit, gleichzeitig erhöhte sich jedoch die Sterblichkeit nach Infektion derart, daß bei einigen Versuchen kein Tier den 7. Tag p.i. überlebte. Als mögliche Ursache hierfür kommt neben einer Steigerung der Virusvermehrung durch Suppression der Infektabwehr auch eine diabetogene Wirkung des Cortisons selbst in Frage.
Neben der allgemein geringen Inzidenz des Virusdiabetes fiel bei den NMRI-Mäusen unter gleichen Versuchsbedingungen eine wechselnde Häufigkeit desselben auf. Dieses Phänomen führen wir auf die Tatsache zurück, daß es sich bei dem NMRI-Stamm um einen Auszuchtstamm mit in Grenzen inhomogenem Genom handelt. Für die weiteren Untersuchungen haben wir deshalb nach einem syngenen Stamm gesucht, dessen Diabeteshäufigkeit nach EMC-Virusinfektion größer ist, bei dem jedoch ebenfalls kein Spontandiabetes auftritt.
Männlich DBA/2-Mäuse erfüllten diese Voraussetzungen. Bei ihnen ließ sich durch die Virusinfektion in über 50 % der Fälle ein Krankheitsbild erzeugen, das die Symptome eines juvenilen Diabetes mellitus des Menschen aufwies.

Die histologischen Veränderungen nach Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus waren im Gegensatz zu den klinischen Befunden bei männlichen und weiblichen Tieren aller untersuchten Mäusestämme qualitativ identisch: Innerhalb von 48 Stunden nach der Infektion tritt eine durch Degranulation, Nekrosen und ein interstitielles Ödem charakterisierte Schädigung der Langerhansschen Inseln des Pankreas auf (MÜNTEFERING, 1972; NOTKINS, 1977). Später kommt es dann zu wechselnd dichten Infiltrationen einzelner Inseln mit einkernigen Rundzellen, vereinzelten Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten. Dieses von MÜNTEFERING (1972) beschriebene Bild wird heute allgemein als Insulitis bezeichnet und gilt als chrakteristisch für das Initialstadium des virusinduzierten Diabetes mellitus der Maus (MÜNTEFERING, 1972; HAYASHI et al., 1974; CRAIGHEAD, 1975, 1977; YOON et al., 1976; NOTKINS, 1977).

Da von dem Virus nur die Langerhansschen Inseln geschädigt werden, stellt sich die Frage, ob alle Inselzellen gleichmäßig betroffen sind. Die Differenzierung von A-Zellen und B-Zellen bereitet im Frühstadium der Infektion jedoch erhebliche Schwierigkeiten. Die zur Darstellung der einzelnen Zelltypen innerhalb der Langerhansschen Inseln gebräuchlichen Färbemethoden (GÖMÖRI, 1941; PAGET, 1959; SCHIEBLER et al., 1959; SCOTT, 1962) setzen voraus, daß die in den einzelnen Zellen spezifisch anfärbbaren Substanzen permanent vorhanden bleiben. Der dabei im Färbeverhalten erzielbare Unterschied wird mit dem Gehalt an im Cytoplasma gespeicherten Hormongranula geringer. Derartige Färbemethoden müssen also dort ihre Grenzen finden, wo eine bestimmte Substanzmenge pro Zelle unterschritten ist.

Dies ist der Fall bei den von uns durchgeführten Untersuchungen, bei denen einmal die Virusschädigung selbst, zum anderen aber auch die durch die Virusschädigung induzierte diabetische Stoffwechsellage zu einer weitgehenden Degranulierung der noch erhaltenen Zellen führen. Zur Darstellung geschädigter Inselzellen wurde in dieser Arbeit deshalb der Nachweis von Insulin und Glukagon mit Hilfe der spezifischen indirekten Immunfluoreszenz geführt. Zur Klärung der Frage, ob die M-Variante des EMC-Virus selektiv die B-Zellen befällt, wurde gleichzeitig das Virus bzw. Virusantigen immunfluoreszenzoptisch dargestellt.

Mit diesen Verfahren konnten wir die aufgrund histologischer und klinischer Befunde geäußerten Vermutungen über eine isolierte B-Zellenschädigung der M-Variante des EMC-Virus innerhalb der Langerhansschen Inseln (HAYASHI et al., 1974) erstmals beweisen. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Virus auch extrainsulär ausschließlich Insulin enthaltende Zellen schädigt. Demnach scheint die M-Variante eine spezifisch insulinotrope Eigenschaft bzw. einen B-Zellentropismus zu besitzen. Dies wird noch dadurch bestätigt, daß in keinem Fall Virusantigen in einer A-Zelle nachgewiesen werden konnte. Diese Angaben über die Qualität der Virusschädigungen stimmen voll mit denen von NOTKINS (1977) überein.
Differenzen bestehen dagegen in den Aussagen über Dauer und Ausmaß der direkten Virusschädigung. Im Gegensatz zu HAYASHI et al. (1974) und NOTKINS (1977), die eine Virusfluoreszenz des Pankreas von der 24. Stunde bis 14. Tag p.i. beschrieben, konnten wir bei unseren Versuchen das EMC-Virus lediglich von der 38. bis zur 96. Stunde nach Infektion immunfluoreszenzmikroskopisch darstellen.

Das spätere A u f t r e t e n des Virus in unseren Experimenten ist möglicherweise durch geringe methodische Unterschiede bei der Verimpfung bedingt. So konnten wir nach intraperitonealen Infektionen und nach Verimpfung einer größeren Virusmenge auch schon vor der 38. Stunde p.i. Virusantigen im Pankreas fluoreszenzmikroskopisch nachweisen.
Von größerer Bedeutung scheint uns die Tatsache zu sein, daß die Arbeitsgruppe um NOTKINS 10 Tage länger als wir einen positiven Virusnachweis im Pankreas führen konnte. Soweit eine geringere Empfindlichkeit der von uns benutzten Fluoreszenzmethode als Ursache hierfür ausscheidet, ist zu überlegen, ob die Virusvarianten völlig identisch sind. In diesem Zusammenhang ist auch auf Differenzen in der gefundenen Diabeteshäufigkeit hinzuweisen.
Während bei unseren Untersuchungen an männlichen und weiblichen Tieren des Stammes NMRI/han und an männlichen Tieren des Stammes DBA/2 unabhängig von Diabeteshäufigkeit und -verlauf, in der akuten postinfektiösen Phase eine qualitativ und quantitativ gleiche Schädigung der B-Zellen zu beobachten war, berichten NOTKINS et al. (1977) über wesentlich geringere Virusschädigung bei Tiergruppen, die nach Virusinfektion keinen Diabetes entwickelten, und sehen die geringere Virusschädigung als Hauptursache der geringeren Diabetesanfälligkeit an. Wir dagegen halten die Infektion mit der M-Variante des Virus für eine notwendige Voraussetzung, nicht jedoch für das letzte Glied in der Kette der Pathogenese des virusinduzierten Diabetes der Maus.

Wegen der Anwesenheit lymphozytärer Infiltrate in den Langerhansschen Inseln infizierter Tiere halten wir die Mitwirkung eines Immunprozesses bei der Entstehung des Diabetes für möglich, der - unabhängig vom Ausmaß der direkten Virusschädigung - durch die Infektion in Gang gesetzt werden könnte.
Auch beim juvenilen Diabetes mellitus des Menschen wird seit längerer Zeit eine Immungenese diskutiert. So fand GEPTS (1965) bei perakutem juvenilen Diabetes an den Langerhansschen Inseln ähnliche Veränderungen, wie sie bei unseren Versuchstieren nach Virusinfektion auftraten. Vor allem auch die Anwesenheit von Antikörpern gegen Inselgewebe im Serum juveniler Diabetiker (BOTAZZO et al., 1974; DEL PRETE et al., 1976; IRVINE et al. 1976, LENDRUM et al. 1976 und 1975; MAC CUISH et al., 1974 MORRIS et al., 1976) unterstreicht die Bedeutung des Immunsystems bei der Entstehung des juvenilen Diabetes mellitus des Menschen.
Da zahlreiche morphologische und klinische Übereinstimmungen zwischen dem juvenilen Diabetes des Menschen und unserem Virusmodell bestehen, liegt der Gedanke an eine immunologische Reaktion des experimentellen Diabetes der Maus nahe. Welchen Stellenwert einem eventuellen immunologischen Faktor zukommt, ist allerdings noch fraglich. JANSSEN et al. (1977) konnten durch Ausschaltung des Immunsystems mittels Röntgenbestrahlung die Entstehung eines Diabetes bei EMC-virusinfizierten Mäusen verzögern. Als Beweis für das Vorliegen einer wirksamen Immunsuppression wurden dabei die fehlende Insulitis und das Fehlen von Virusantikörpern im Serum der bestrahlten Tiere angesehen.

Die Tatsache, daß bei dem Versuch einer Immunsuppression durch das Cytostaticum Cyclophosphamid - das vorwiegend die B-Lymphozyten und damit die Antikörperproduktion hemmt - vergleichbare Ergebnisse nicht erzielt werden konnten, läßt auf das Vorliegen eines Autoimmunprozesses mit vorrangiger Bedeutung der T-Lymphozyten schließen.

Mit dem Vorliegen einer Immunreaktion könnte auch der in Tabelle 4 beschriebene Verlauf der Blutzuckerkurve chronisch diabetischer DBA/2-Mäuse erklärt werden. Der konstante Anstieg der Blutglukosewerte bis zum 7. Tag p.i. kann als Ausdruck direkter Schädigung der B-Zellen und den dadurch bedingten Insulinmangel interpretiert werden. Die Tatsache, daß zwischen der 1. und 3. post-infektiösen Woche eine Gruppe von bis dahin diabetischen Tieren wieder normoglykämisch wird, wäre danach Zeichen einer protektiven Immunreaktion mit Eleminierung des Virus durch neutralisierende Antikörper. Wenn man davon ausgeht, daß durch die Virusschädigung der Inseln eine Sensibilisierung von T-Lymphozyten eintritt, kann man das Verbleiben der zweiten Gruppe von Tieren im chronisch diabetischen Bereich als Ausdruck einer Zerstörung von bis dahin intakten B-Zellen durch Autoaggression deuten.

Gerade das Vorliegen einer Autoimmunitätsreaktion wird durch neuere Untersuchungen wieder in Frage gestellt. Dabei konnte trotz anfänglicher Erfolge (MÜNTEFERING, BINER, KOLB, JANSSEN, 1977) letztlich nicht bewiesen werden, daß eine Übertragung von Milzlymphozyten virusinfizierter Mäuse auf gesunde syngene Tiere bei diesen eine Autoimmunitätsinsulitis verursachen kann (MÜNTEFERING, KOLB, 1978, persönliche Mitteilung). Die Diskussion über die endgültige Bedeutung immunologischer Faktoren in der Pathogenese des EMC-virusinduzierten Diabetes mellitus der Maus ist also noch nicht abgeschlossen und wird noch weitere tierexperimentelle Untersuchungen erfordern.

Neben der von allen Autoren anerkannten direkten Schädigung der B-Zellen durch das EMC-Virus und dem möglichen Einfluß immunologischer Faktoren scheinen auch männliche Sexualhormone die Entstehung des virusinduzierten Diabetes bei bestimmten Mäusestämmen zu begünstigen. Dafür sprechen Untersuchungen von MÜNTEFERING (1971), BOUCHER (1973 u. 1975) und ROSS (1975), nach denen sich fast ausschließlich bei männlichen Mäusen der verschiedenen Stämme ein Diabetessyndrom hervorrufen läßt, während nur bei einzelnen weiblichen Tieren kurzfristige Diabetessymptome auftreten. Auch in unseren Versuchen wurden ausschließlich männliche Tiere diabetisch. Einen weiteren Anhaltspunkt für die Bedeutung der Sexualhormone geben die von NOTKINS (1977) durchgeführten Versuche mit frühzeitig kastrierten männlichen DBA/2-Mäusen, bei denen sich nach EMC-Infektion allenfalls Symptome eines latenten Diabetes entwickelten.

Die Bedeutung genetischer Faktoren für die Entstehung des experimentellen Diabetes ergibt sich nicht nur aus der Diabetesempfänglichkeit weniger Mäusestämme, sondern auch aus den Kreuzungsversuchen von YOON et al. (1976). Diese konnten durch Kreuzung von diabetesresistenten und diabetesempfänglichen Mäusen zeigen, daß die Eigenschaft nach Virusinfektion einen Diabetes zu entwickeln, autosomal-rezessiv vererbt wird.

Da auch bei syngenen Tierstämmen nicht bei allen Tieren eines Stammes nach Virusinfektion ein Diabetes auftritt, müssen darüber hinaus auch noch individuelle Faktoren bei der Diabetesentstehung wirksam sein. Die in dieser Hinsicht von ROSS et al. (1976) geführte Diskussion über den Einfluß von Umweltfaktoren und Lebensgewohnheiten der Tiere geht über Vermutungen nicht hinaus.

Nach dem derzeitigen Stand der Erforschung des EMC-virusinduzierten Diabetes mellitus der Maus kommt es durch die Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus zu einer selektiven Schädigung der B-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas, die zu der Entstehung einer diabetischen Stoffwechsellage führt. Deren Häufigkeit und Verlauf scheinen durch immunologische, hormonelle, genetische und individuelle Faktoren gesteuert zu werden.

6.0 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird das Ausmaß der direkten Schädigung der M-Variante des EMC-Virus in den Langerhansschen Inseln verschiedener Mäusestämme untersucht. Dazu war es notwendig, das Virus im Gewebe nachzuweisen und gleichzeitig die von ihm geschädigten Zellen zu identifizieren. Beides wurde mit der hier entwickelten Mehtode der indirekten Immunfluoreszenz erreicht. Die Methoden werden ausführlich dargestellt.

Es wurde nachgewiesen, daß die M-Variante des EMC-Virus selektiv die B-Zellen in den Langerhansschen Inseln der Maus schädigt. Das Ausmaß dieser Schädigungen war bei allen untersuchten Tieren - unabhängig vom Stamm, Alter und Geschlecht - gleich. Auch die Tiere, die zu keinem Zeitpunkt nach der Infektion diabetisch wurden, wiesen den gleichen Befall der B-Zellen durch das Virus auf, wie die Tiere, die diabetisch geworden waren. Bei unseren Untersuchungen ließ sich das Virus immunfluoreszenzmikroskopisch in den B-Zellen der Versuchstiere längstens bis zur 96. Stunde post infectionem nachweisen, obwohl bei den Tieren mit permanentem Diabetes auch noch danach die Schädigung der Inseln weiter fortschritt. Die Zahl der B-Zellen nahm im Verlauf der Infektion weiter ab, die der A-Zellen nahm in den Schnittflächen der Inseln zu.

Für die Entstehung des experimentellen Virusdiabetes der Maus spielen demnach genetische, hormonelle, immunologische und individuelle Faktoren eine wesentliche Rolle. Die Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus ist deshalb wahrscheinlich nur die notwendige Voraussetzung, nicht jedoch das letzte Glied in der Kette der Pathogenese des virusinduzierten Diabetes der Maus.

Literaturverzeichnis

Baum, J.D., Aynsley-Green, A., McCallum, F.O.,
Coxsackie viruses and diabetes mellitus.
Brit.Med.J. 3, 172 (1974)

Bottazzo, G.F., Florin-Christensen, A., Doniach, D.,
Isletcell antibodies in diabetes mellitus
with autoimmune polyendocrine defiencies.
Lancet 1974/2, 1279-82

Boucher, D.W., Notkins, A.L.,
Virus-induced diabetes mellitus
I. Hyperglycemia and hypoinsulinemia in
mice infected with encephalomyocarditis
virus.
J.exp.Med. 137, 1226-1239 (1973)

Boucher, D.W., Hayashi, K., Rosenthal, J., Notkins, A.L.,
Virus-induced diabetes mellitus.
III. Influence of sex and strain of the
host.
J. Infect. Dis. 131, 462-466 (1975)

Burch, G.E., Tsui, C.Y., Harb, J.M.,
Pankreatitis of mice infected with
encephalomyocarditis virus.
Path. Mikrobiol. 40, 281-296 (1974)

Craighead, J.E., Pathogenicity of the M and E variants of
the Encephalomyocarditis (EMC) virus.
I. Myocardiotropic and neurotropic
properties.
Amer. J. Path. 48, 333-341 (1966)

Craighead, J.E., Pathogenicity of the M and E variants of
the Encephalomyocarditis (EMC) virus.
II. Lesions of the pancreas, parotid and
lacrimal glands. Amer. J. Path. 48,
375-382 (1966)

Craighead, J.E., McLane, M.F.,
Diabetes mellitus: Inducation in Mice by Encephalomyocarditis Virus. Science 162, 913-914 (1968)

Craighead, J.E., Steinke, J.,
Diabetes mellitus-like syndrome in mice infected with encephalomyocarditis virus. Am J. Pathol. 63, 119-130 (1971)

Craighead, J.E., Kanich, R.E., Kessler, J.B.,
Lesions of the islets of Langerhans in encephalomyocarditis virus-infected mice with diabetes mellitus-like disease. II. Acute lesions.
Am J. Pathol 74, 287-300 (1974)

Craighead, J.E., Higgins, D.A.,
Genetic inluences affecting the occurence of a diabetes mellitus-like disease in mice infected with the encephalomyocarditis virus. J.Exp.Med. 139, 414-426 (1974)

Craighead, J.E., The Role of Viruses in the Pathogenesis of Pancreatic Disease and Diabetes Mellitus. In: Melnick, J.L. (ed.), Progress in Medical Virology, Vol. 19, 162-214. Basel-München Paris-London-New York-Sydney: S. Karger 1975

Craighead, J.E., Virus induced insulitis in experimental animal models. Acta endocrinol. (Suppl.) (KBH) 83 Supp. 205 123-8 / 1976

Cudworth, A.G., Woodrow, J.C.,
HLA-Antigens and diabetes mellitus
Lancet 1974/2, 1153

Del Prete, G.F., Betterle, C., Bersani, G., Romano, M., Tiengo, A., Pancratic Islet Cell Autoimmunity. Lancet II 1090 (1976)

Egberg, J., Junker, K., Kromann, K., Nerup, J.,
Autoimmun Insulitis. Pathological Findings in Experimental Animal Models and Juvenile Diabetes Mellitus. Acta endocrinol. (Supp.) (KBH), 83 Suppl. 205 129-137 / 1976

Forrest, J.M., Menser, M.A.,
High frequency of diabetes mellitus in young adults with congenital rubella. Lancet 1971, 332-334

Freytag, G.H., Immunpathologie des Diabetes mellitus. Tierexperimentelle Studie zum Anti-Insulin-Diabetes. Stuttgart: Gustav Fischer 1972

Gamble, D.R., Kinsley, M.L., Fitzgerald, M.G., Bolton, R., Taylor, K.W., Viral antibodies in diabetes mellitus. Br.Med. J. 3, 627-630 (1969)

Gamble, D.R., Coxsackie viruses and diabetes mellitus Brit.med. J. 4, 260-262 (1973)

Gamble, D.R., Viral and epidemiological studies. J. clinical Path. 27, 929 (1974)

Gamble, D.R., Taylor, K.W.,
Seasonal incidence of diabetes mellitus Br.Med. J. 5, 850-862 (1973)

Gamble, D.R., Epidemiological and virological observations on juvenile diabetes. Postgrad. Med. J. 50, (Suppl. 3) 538-543 (1974)

Gamble, D.R., Nelson, P.G., Pyke D.A.,
Diabetes and virus infection. Lancet 1974/2, 1509

Gepts, W., Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus.
Diabetes 14, 619-633 (1965)

Gepts, W., Islet changes suggesting a possible immune aetiology of human diabetes mellitus
Acta endocrinol. (Suppl.) (KBH) 83
Suppl. 205 95-106 / 1976

Gomori, G., A differential stain for cell types in the pancreas islets.
Amer. J. Path. 15, 497-499 (1941)

Gomori, G., Aldehydfuchsin: A new stain for elastic tissue.
Amer.J.clin.Path. 20, 665-666 (1950)

Hadden, D.R., Conolly, J.H., Montgomery, D.A.D., Weaver, J.A., Coxsackie B virus and diabetes.
Br.Med. J. 4, 729 (1972)

Hayashi, K., Boucher, D.W., Notkins, A.L., Virus-induced diabetes mellitus.
II. Relationship between beta cell damage and hyperglycemia in mice infected with the encephalomyocarditis virus.
Am.J.Path. 75, 1 91-97 (1974)

Helwig, F.C., Schmidt, E.C., A filter passing agent producing interstitiell myocarditis in antropoid apes and small animals
Science 102, 31 (1945)

Huff, J.C., Hierholzer, J.C., Farris, W.A., An "outbreak" of juvenile diabetes mellitus: Consideration of a viral etiology.
Am.J.Epidemiol. 100, 277-287 (1974)

Irvine, W.J., Gray, R.S., McCallum, C.J.,
Pancreatic Islet-Cell Antibody as a Marker for Asymptomatic and Latent Diabetes and Prediabtes. Lancet ii, 1097-1125 (1976)

Jansen, F.K., Müntefering, H., Schmidt, W.A.K.,
Virus Induced Diabetes and the Immune System I.Suggestion that Appearance of Diabetes Depends on Immune Reactions. Diabetologia 13, 545-549 (1977)

Klöppel, G., Altenähr, E., Freytag, G., Jansen, F.K.,
Immune insulitis and manifest diabetes mellitus.
Virch.Arch.A Path. Anat. and Hist. 364, 333-346 (1974)

Kordian, Ch., Müntefering, H., Klinger, H., Tsotsalas, M.,
Quantitative Morphologie der Langerhansschen Inseln im Ablauf des virusinduzierten Diabetes mellitus der Maus.
(in Vorbereitung)

Lange, R.H.,
Korrelative Licht- und Elektronen-mikroskopie unter Berücksichtigung der Histochemie.
Mikroskopie 28, 193-199 (1972)

Lazarus, S.S., Volk, B.W.,
Ultramicroscopic and histochemical studies on pancreatic B-cells stimulated by tolbutamide.
Diabetes 11, 2-10 (Supp.) (1962).

Lendrum, R., Walker, G., Gamble, D.R.,
Islet-cell antibodies in juvenile diabetes mellitus of recent onset.
Lancet 1975, 880-883

Lendrum, R., Walker, G., Cudworth, A.G., Theophaxides, C., Pyke, D.A., Bloom, A., Gamble, D.R.,
Islet-Cell Antibodies in Diabetes mellitus.
Lancet II 1273-1276 (1976)

Levine, R., Glucagon and the regulation of blood sugar.
N.Engl. J.Med. 294, 494-495 (1976)

Like, A.A., Rossini, A.A.,
Streptozotocin-induced pancreatic insulitis: New model of diabetes mellitus-
Science 193, 415-417 (1976)

Lomsky, R., Immunfluorescent demonstration of gastrin and glucagon in man.Horm.metab.res.3
Suppl. 3 : 14-7 (1971)

MacCuish, A.C., Barnes, E.W., Irvine, W.J., Duncan, L.J.P.,
Antibodies to pancreatic islet cells in insulin-dependent diabetics with coexistent autoimmune disease.
Lancet 1974/2, 1529-1531

MacLaren, N.K., Huang, S.W., Fogh, J.,
Antibody to culured human insuloma cells in insulin-dependent diabetes.
Lancet 1975, 997-999

Melnick, J.L., Cockburn, W.C., Dalldorf, G., Gard, S., Gear, J.H.S., Hammon, W.M., Kaplan, M.M., Nagler, F.P., Oker-Blom, N., Rhodes, A.J., Sabin, A.B., Verlinde, S.D., v. Magnus, H., Picornavirus group, Vorology 19, 114-116 (1963)

Morris, P.J., Irvine, W.J., Gray, R.S., Duncan, L.J.Pl, Vaighan, H., McCallum, F.J., Campbell, C.J., Farquhar, J.W.,
HLA and Pancreatic Islet Cell Antibodies in Diabetes.
Lancet II 652-653 (1976)

Müntefering, H., Schmidt, W.A.K., Körber, W.,
Experimenteller Beitrag zur Virusgenese des Diabetes mellitus bei der weißen Maus.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 54, 669-670 (1970)

Müntefering, H., Schmidt, W.A.K., Körber, W.,
Zur Virusgenese des Diabetes mellitus bei der weißen Maus.
Dtsch. Med. Wochenschr. 96, 693-697 (1971)

Müntefering, H.,Zur Pathologie des Diabetes mellitus der weißen Maus bei der EMC-Virusinfektion. Histologische, elektronenmikroskopische und quantitativ morphologische Befunde an den Langerhansschen Inseln.
Virchows Arch. Path. Anat. 356, 207-234, (1972)

Müntefering, H.,Ultrastructure of viral insulitis.
Proc. VIII. Congress of the Int. Federation of Diabetes, Brussels 1973.
Excerpta medica 312, 316-320 (1973)

Müntefering, H., Schmidt, W.A.K., Kieker, W.R.,
Passing insulitis in virus-induced diabetes mellitus in white mice (Histological, ultrastructural and immunofluorescentopical findings).
Excerpta medica, Intern. Congr. Series, N 280, 138 (1973)

Müntefering, H.,Experimental virus-induced diabetes mellitus accompanied by insulitis.
Proc. VIII. Congress of the Int. Federation of Diabetes, Brussels (1973)
Excerpta medica 312 (1973)

Müntefering, H.,Diabète d'origine virale.
Journées de diabetologie
Hôtel Dieu.
1974, 181-190

Müntefering, H., Stüeken, E.,
Virusinfektion und Diabetes mellitus:
Fluoreszenzmikoskopischer Virusnachweis
im Pankreas verschiedener Mäusestämme.
10. Kongreß der Deutschen Diabetes-Gesellschaft Ulm 1975, Vortrag Nr. 49

Müntefering, H., Biener, J., Hillebrand, E.,
Autoantibodies to islet cells in juvenile
diabtes (abstr. Nr. 196, Twelfth annual
meeting of the european association for
the study of diabetes)
Diabetologia 12, 411 (1976)

Nelson, P.G., Pyke, D.A., Gamble, D.R.,
Viruses and the Aetiology of Diabetes:
A Study in Identical Twins.
Brit.med.J. 4., 249-251 (1975)

Nerup, J., Andersen, O.O., Bendixen, G., Egeberg, J.,
Gunnarsson, R., Kromann, H., Poulsen, J.E.,
Glucose intolerance and islet damage in
mice immunized with homologous endocrine
pancreas A preliminary communication.
Horm.Metab.Res. 6, 173-175 (1974)

Nerup, J., Andersen, O.O., Christy, M., Platz, P., Ryder, L.,
Thomsen, M., Svejgaard, A.,
HLA, autoimmunity, virus and the pathogenesis
of juvenile diabetes mellitus
Acta endocrinol. Vo. 83, Suppl. 205
167-181 (1976)

Notkins, A.L., Virus-Induced Diabetes Mellitus. Arch. Virol.
54, 1-17 (1977)

Petersen, K.-G., Heilmeyer, P., Kerp, L.,
Synthesis of proinsulin and large glucagon immunoreactivity in isolated Langerhans islets from EMC-virus infected mice.
Diabetologia 11, 21-25 (1975)

Petersen, K.-G., Müntefering, H., Kerp, L.,
Function of Langerhans'islets in the EMC-virus induced diabetes-syndrome of DBA/2-mice.
(Abstr. Nr. 214, Twelfth annual meeting of the european association for the study of diabetes)
Diabetologia 12, 415 (1976)

Poetschke, G., Uehleke, H., Killisch, L.,
Untersuchungen mit fluoreszenz-markierten Antikörpern. V.Gleichzeitiger Nachweis mehrerer Antigene durch verschieden gefärbte fluoreszierende Antikörper am Beispiel von Proteus morganii und bacillus cereus.
Schweiz.Z.Path. Bakt. 22, 758-765 (1959)

Ross, M.E., Onodera, T., Brown, K.S., Notkins, A.L.,
Virus-induced diabetes mellitus
IV. Genetic and environmental factors influencing the development of diabetes after infection with the M-variant of encephalomyocarditis virus.
Diabetes 25, 190-197 (1976)

Rubenstein, P., Suciu-Foca, N., Nicholson, J.F., Fotino, N., Molinaro, A., Harisiadis, L., Hardy, M.A., Reemtsma, K., Allen, F.H.,
The HLA System in the Families of Patients with Juvenile Diabetes Mellitus.
J.exp.Med. 143, 1277-1282 (1976)

Schernthaner, G., Ludwig, H., Mayr, W.R.,
Juvenile Diabetes Mellitus:
HLA-Antigen Frequencies Deipendent on
the Age of Onset of the Disease.
J.Immunogen. 3, 117-121 (1976)

Schiebler, Th.H., Schiessler, S.,
Über den Nachweis von Insulin mit den
metachromatisch reagierenden Pseudoiso-
cyaninen. Histochemie 1, 445-465 (1959)

Schmidt, W.A.K., Klein, M.,
Ein Latex-Agglutinations-Hemmtest
(LAH-Test) zur Bestimmung von Antikörpern
gegen Enteroviren.
Arch. Virol. 44, 255 (1974)

Schmidt, W.A.K., Klein, M.,
Der Latex-Agglutinations-Hemmtest,
eine Methode zur schnellen Antikörper-
bestimmung nach Enterovirusinfektion.
Dtsch. Med. Wochenschr. 99, 2099 (1974)

Schmidt, W.A.K., Klein, M.,
Die Persistenz latexagglutinations-
hemmender Antikörper in Kaninchen nach
Applikation von Poliomyelitis-, Coxsackie-,
Echo- und Enzephalomyokarditis-Viren.
Arch. Virol. 47, 291 (1975)

Singal, D.P., Blajchman, M.A.,
Histocompatibility (HL-A) Antigens,
Lymphocytotoxie Antibodies and Tissue
Antibodies in Patients with Diabetes
Mellitus.
Diabetes 22, 429-432 (1973)

Starke, G., Übersicht über die animalen Virusgruppen
und Virustypen
in Grundriß der Allgemeinen Virologie
Hrsg. von G. Starke und P. Hlinak
2 . Aufl. Stuttgart, Gustav Fischer 1974

Stringfellow, W.A., Glasgow, L.A.,
Hyporeactivity due to infection: Recognition of a transferable hyporeaktive factor in the serum of encephalomyocarditis virus-infected mice.
Infection and immunity 10, 2, 1337-1342 (1974)

Stüeken, E., Müntefering, H., Schmidt, W.A.K., Jansen, F.K., Rick, W.
Immunologische Darstellung der B- und A-Zellen im Pankreas der DBA/Maus im Verlauf der EMC- Virusinfektion.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 59, 584 (1975)

Svejgaard, A., HLA Factors and Immun Function
Acta endocrinol. Vo. 83 Suppl. 205
77-84 (1976)

Thomsen, M., Platz, P., Andersen, O.O., Christy, M., Lyngsoe, J., Nerup, J. Rasmussen, K., Ryder, L.P., Nielsen, L.S., Svejgaard, A.,
MLC Typing in Juvenile Diabetes mellitus and Idiopathie addisons's Disease.
Transplant Rev. 22 125-147 (1975)

Tsui, C.-Y., Burch, G.E., Harb, J.M.,
Pancreatitis in mice infected with coxsackievirus B1. Arch. Path. 93, 379 (1972)

Unger, R., Orci, L.,
The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus.
Lancet 1975/1, 14-16

Vivell, O. Columbia-SK-Virusgruppe
in Virus und Rickettsieninfektionen
des Menschen
Hrsg. von R. Haas u. O. Vivell
1 . Aufl. München, Lehmanns 1965

Wellmann, K.F., Amsterdam. D., Brancato, P., Volks, P.W.,
Fine Structure of Pancreatic Islets of
Mice Infected with the M Variant of the
Encephalomyocarditis Virus.
Diabetologica 8, 349-357 (1972)

Yoon, J.W., Notkins, A.L.,
Virus-Induced Diabetes Mellitus VI.
Genetically Determined Host Differences
in the Replication of Encephalomyocarditis
Virus in Pancreatic Beta Cells.
J.exp.Med. 143, 1170-1185 (1976)

Unser ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Müntefering, Pathologisches Institut der Universität Düsseldorf, Abt. Kinderpathologie. Nach Überlassung des Themas stand er uns bei allen auftretenden technischen und methodischen Problemen mit Rat und Tat zur Seite. Seine ständige Diskussionsbereitschaft, die stets konstruktive Kritik und das überaus große Engagement für die Fertigstellung der Arbeit waren uns eine wertvolle Hilfe.

Lebenslauf

Am 14. April 1947 als Sohn des Arztes Dr. Engelbert Stüeken und seiner Ehefrau, der Ärztin Dr. Cäcilia Stüeken geb. Hennes in Balve/Westfalen geboren; nach Besuch der Volksschule und des Gymnasiums 1966 Ablegen der Reifeprüfung als Schüler des humanistischen Zweiges des Walram-Gymnasiums in Menden.

Studium der Medizin in Saarbrücken und Homburg/Saar, dort medizinische Vorprüfung im April 1969. Klinischer Teil des Studiums an den Universitäten Kiel und Hamburg, hier medizinisches Staatsexamen im Dezember 1972. Als Medizinalassistent in der Medizinischen Universitätsklinik und in der Frauenklinik Finkenau in Hamburg sowie in der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Uetersen. Erteilung der Approbation als Arzt am 7. März 1974 durch den Gesundheitssenator der Freien und Hansestadt Hamburg.

Vom Juni 1974 bis Juli 1975 als wissenschaftlicher Assistent im Pathologischen Institut der Universität Düsseldorf, hierbei experimentelle Arbeiten über den virusinduzierten Diabetes der Maus. Anschließend Ableistung des Grundwehrdienstes beim Bundesgrenzschutz in Schwarzenbek. Seit April 1975 im Krankenhaus am Bürgerpark in Bremerhaven als Assistenzarzt tätig.